

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 26, 1988, pp. 15–24

© 1988 Walter de Gruyter & Co.
Berlin · New York

Eine kinetische Methode zur direkten Bestimmung des Kreatinins im Serum mit 3,5-Dinitrobenzoesäure ohne Enteiweißung

Von M. Sabbagh, W. Rick und S. Schneider

Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Universität Düsseldorf

(Eingegangen am 18. März/20. November 1987)

Zusammenfassung: In der vorliegenden Arbeit wird über eine kinetische Methode zur Bestimmung des Kreatinins im Serum mit alkalischer 3,5-Dinitrobenzoatlösung ohne Enteiweißung berichtet. Meßgröße ist die Absorptionszunahme bei 546 nm durch die Bildung eines orange-roten Farbkomplexes. Die Methode weist eine lineare Beziehung zwischen der eingesetzten Kreatinin-Konzentration und dem Meßsignal bis zur geprüften Konzentration von 8840 µmol/l wäßriger Standardlösung auf. Die Wiederfindungsrate im Aufstockungsversuch beträgt 98–102%. Im Vergleich zu der von Helger et al. (Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 12, 344–349 (1974)) modifizierten Methode nach Jaffé zeigt das ausgearbeitete Verfahren geringere Störungen in Anwesenheit von Pseudokreatinin-Chromogenen und keine Interferenzen durch hohe Bilirubin- und Triglycerid-Konzentrationen im Serum. Ebenso ergibt sich unter Cephalosporin-Therapie keine Beeinflussung der gemessenen Kreatinin-Konzentrationen. Die Störeinflüsse und Nebenreaktionen sind durch Optimierung der Konzentrationen aller Reaktionspartner sowie der Meßzeit herabgesetzt bzw. eliminiert worden.

Die Bestimmung der Kreatinin-Konzentration im Serum kann mit dem beschriebenen Verfahren allerdings nur an mechanisierten Analysengeräten durchgeführt werden, die es gestatten, wenige Sekunden nach Start der Reaktion Absorptionsänderungen in kurzen Zeitintervallen zu messen. Vergleichsuntersuchungen an 212 Seren zeigen übereinstimmende Ergebnisse zwischen der Dinitrobenzoat-Methode und dem enzymatischen UV-Test. Die modifizierte Jaffé-Methode nach Helger et al. führt zu signifikant höheren Werten.

A kinetic method for the direct determination of creatinine in serum with 3,5-dinitrobenzoic acid without deproteinization

Summary: A kinetic method is reported for the determination of creatinine in serum without deproteinization, using alkaline 3,5-dinitrobenzoate solution. The increase in absorbance at 546 nm due to the formation of an orange-red complex is measured. The relationship between the creatinine concentration and absorbance was linear up to a tested concentration of 8840 µmol/l in the aqueous standard solution. Recovery of added creatinine was 98–102%. Compared with the procedure of Jaffé, as modified by Helger et al. (Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 12, 344–349 (1974)), the present method shows less interference by pseudo-creatinine chromogens, and no interference by high serum concentrations of bilirubin or triacylglycerols. The measured serum concentration of creatinine was not affected by cephalosporin therapy. Interferences and side reactions have been minimized or eliminated by optimization of the concentrations of all reactants and of the measurement time.

The described procedure can, however, only be performed in an instrument, which permits the measurement of absorbance changes in short time intervals after the start of the reaction. In comparative studies on 212 sera, the dinitrobenzoate method and the enzymic UV-test gave similar results, whereas the Jaffé method as modified by Helger et al. gave significantly higher values.

Einführung

Die von Jaffé (1) 1886 erstmals beschriebene Reaktion stellt die Grundlage zahlreicher Verfahren zur Bestimmung der Kreatinin-Konzentration in Serum und Harn dar. Kreatinin bildet mit Pikrinsäure im alkalischen Milieu einen orange-roten Farbkomplex mit einem Absorptionsmaximum bei 490 nm. Da jedoch außer Kreatinin zahlreiche andere Substanzen mit alkalischer Pikratlösung reagieren, sind die ausgearbeiteten Testmodifikationen (2–11) nicht spezifisch. Unter den über 50 bekannten störenden Verbindungen ist zwischen positiv interferierenden (z. B. Acetessigsäure, Aceton, Ascorbinsäure, Cephalosporine, Glucose, Glycocyamidin, Pyruvat u. a.) und negativ beeinflussenden Substanzen (vor allem Bilirubin) zu unterscheiden. Das Ausmaß der Interferenzen ist von den Testbedingungen abhängig (2–16).

Durch Einführung kinetischer Verfahren ohne Enteiweißung (2) konnten die Störungen durch positiv interferierende Substanzen – sogenannte Pseudokreatinin-Chromogene – vermindert werden. Andererseits bleibt Bilirubin im Testansatz enthalten, so daß der bei Methoden mit Enteiweißung eliminierte Einfluß des Gallenfarbstoffs bei den kontinuierlichen Meßverfahren eine besondere Rolle spielt. Bei der von Helger et al. (2) ausgearbeiteten kinetischen Methode führt beispielsweise Bilirubin in einer Konzentration von 257 µmol/l zu einer fälschlich um 80 µmol/l zu niedrigen Kreatinin-Konzentration (12–16).

Auf der Suche nach einer spezifischen Methode zur Bestimmung von Kreatinin fanden Benedict & Behre 1936 (17), daß 3,5-Dinitrobenzoat – ähnlich wie Pikrat – mit der zu bestimmenden Substanz reagiert. Modifikationen zur Bestimmung der Kreatinin-Konzentration in Serum und Harn mit 3,5-Dinitrobenzoat sind von mehreren Autoren (18–21) beschrieben worden. Alle ausgearbeiteten Verfahren stellen Endpunktmethode dar und erfordern eine Enteiweißung der Proben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein kinetisches Verfahren ohne Enteiweißung unter Verwendung von 3,5-Dinitrobenzoat auszuarbeiten, bei dem auch der Einfluß der Störfaktoren gering gehalten wird.

Material und Methoden

Reagentien

1. 3,5-Dinitrobenzoesäure, 99%, Merck 138.
2. Merckotest Kreatinin, Merck 3384.
3. Standardreihe Preciset (88–530 µmol/l Kreatinin), Boehringer Mannheim 125547.
4. Kreatinin, enzymatisch, Test-Combination, Boehringer Mannheim 166413.

5. Natronlauge, 0,5 mol/l, Riedel-de Haën 5071.
6. Natronlauge, 1 mol/l, Riedel-de Haën 5179.
7. Natronlauge, 2 mol/l, Riedel-de Haën 38224.
8. Kreatinin, 99%, zur Kreatinin-Bestimmung im Blut, Merck 5208.
9. Human-Albumin, reinst, Behringwerke ORHA 20/21.
10. Acetessigsäure, Lithiumsalz, 90–95%, Sigma A 8509.
11. Aceton, zur Analyse, Merck 14.
12. Ascorbinsäure, reinst, Merck 500074.
13. Bili-Control, Merz und Dade 170325.
14. Brenztraubensäure, > 98%, Merck, M. S. 820170.
15. D(+)-Glucose, wasserfrei, für biochem. Zwecke, Merck 8337.
16. Intralipid, 20%, Kabi Vitrum 129-2.
17. Cefoxitin, Natriumsalz, 95%, Merck, Sharp und Dohme G 3356.
18. Cephaloglycin, 98,4%, Sigma C 4645.
19. Cephaloridin, 20–30% Aktivität, Sigma C 3519.
20. Cephalothin, 94,5%, Sigma C 4520.

Lösungen

Die folgenden Stammlösungen wurden in den angegebenen Konzentrationen in bidest. Wasser angesetzt:

1. 3,5-Dinitrobenzoat-Farbreagens:
300 mmol/l 3,5-Dinitrobenzoesäure in 300 mmol/l Natronlauge. Bei Raumtemperatur über 6 Monate haltbar.
2. 3,5-Dinitrobenzoat-Stammlösung, 400 mmol/l 3,5-Dinitrobenzoesäure in 400 mmol/l Natronlauge.
3. Human-Albumin-Lösung, 80 g/l in 0,15 mol/l NaCl-Lösung.
4. Kreatinin-Stammlösung, 354 µmol/l in Lösung 3.
5. Kreatinin-Stammlösung, 8840 µmol/l.
6. Hämoglobin-Stammlösung, 4 g/l, hergestellt aus gewaschenen, hypoton lysierten Human-Erythrocyten.
7. Intralipid-Stammemulsion, 45,6 mmol/l Triglyceride in Emulsion.
8. Stammlösungen der Cephalosporin-Präparate (s. Reagentien 17–20), 2 g/l.
9. Li-Acetat-Stammlösung, 5,6 mmol/l.
10. Aceton-Stammlösung, 17,2 mmol/l.
11. Ascorbinsäure-Stammlösung, 300 mg/l.
12. D(+)-Glucose-Stammlösung, 111 mmol/l.
13. Brenztraubensäure-Stammlösung, 11 mmol/l.
14. Human-Albumin-Stammlösung, 100 g/l.

Probenmaterial

1. Seren von Gesunden.
2. Seren von Patienten mit Nierenerkrankungen.
3. Seren von Patienten mit ausgeprägter Hyperlipoproteinämie, Triglycerid-Konzentrationen < 5,7 mmol/l.
4. Seren von Patienten mit ausgeprägtem Ikterus, Bilirubin-Konzentrationen > 120 µmol/l.
5. Poolserum mit einer Kreatinin-Konzentration von 106 µmol/l. Durch Aufstockung mit Kreatinin wurden Kreatinin-Konzentrationen von 283, 460, 636, 813, 990, 1432, 1874, 2758, 4526, 6736 und 8946 µmol/l hergestellt.
6. Poolseren mit Kreatinin-Konzentrationen von 52 bzw. 251 µmol/l.
7. Kontrollserum Decision Level 1, Beckman 660400, Lot C 401202.
8. Kontrollserum Decision Level 3, Beckman 660410, Lot C 401204.
9. Poolserum mit einer Kreatinin-Konzentration von 106 µmol/l und einer Bilirubin-Konzentration von 9 µmol/l. Durch Aufstockung mit Bili-Control wurden Bilirubin-Konzentrationen von 212, 400, 585, 693, 929 und 1211 µmol/l hergestellt.

CLUSTER ANALYSIS IN CLINICAL CHEMISTRY

A Model

W. VOGT, D. NAGEL and H. SATOR, Institut für Klinische Chemie, Deutsche Herzzentrum München des Freistaates Bayern, Munich, West Germany

Clinical samples are increasingly important as a source for diagnosis and cluster analysis is an important technique for enhancing the results available.

This book shows, through an explanation of the theory and the demonstration of a clinical example, how cluster analysis can aid clinical diagnosis. It provides the clinical chemist with a statistical method for enhancing clinical diagnosis. The basic statistical theory is developed, indicating areas of potential problems, leading on to apply the technique by means of a clinical examples. Disadvantages of the analysis are discussed as well as the benefits for the clinician who is required to interpret a mass of data.

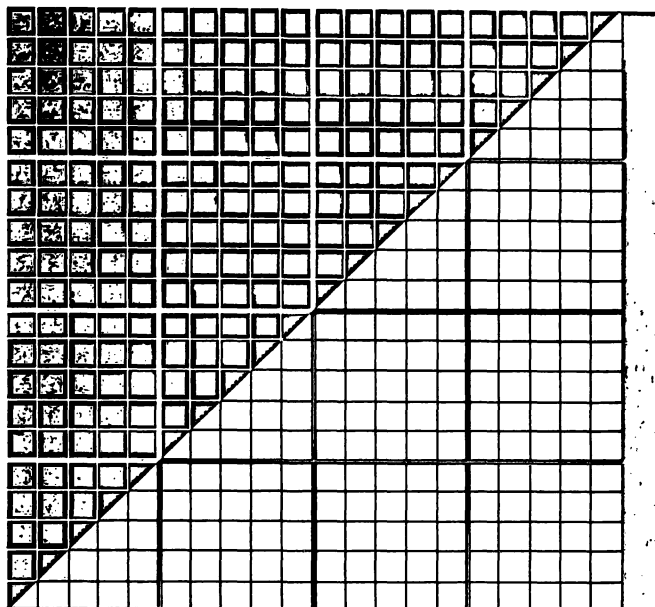
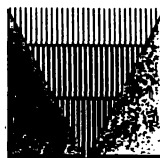
0471915548 192 pages October 1987 £24.00/\$47.95

John Wiley & Sons Ltd

Baffins Lane, Chichester,
Sussex PO19 1UD, England



Forum for Innovations for Biochemical and Instrumental Analysis



The Trendsetter for
Biotechnology, Gene Technology,
Environmental Analysis

Analytica 88

11th International Exhibition

19-22 April 
Munich

MESSMÜNCHEN  INTERNATIONAL

Coupon - Analytica 88

Please send further information on Analytica.

Name

Street/P.O. Box

Town, Postal code

Country

Organizer: Münchener Messe- und Ausstellungsgesellschaft mbH, Postfach 12 10 09, D-8000 München 12,
Telephone (89) 51 07-0, Telex 5 212 086 ameg d.

Peptides 1986

Proceedings of the 19th European
Peptide Symposium Porto Carras,
Chalkidiki, Greece,
August 31-September 5, 1986

Editor D. Theodoropoulos

1987. 17 cm x 24 cm. XIX, 684 pages. With numerous illustrations. Hardcover DM 320,- ISBN 3 11 010687 6

The topics of the proceedings contained in this volume extend from the most modern peptide synthesis to sophisticated techniques of conformational analysis utilizing computer graphics for understanding the biological function of active peptides as well as the principles for designing new drugs.

Contents (Main Chapters)

In memoriam Karel Jöst The Josef Rudinger Memorial Lecture: An Introductory Note · The First Josef Memorial Lecture Prediction of potency and receptor selectivity of regulatory peptides: The membrane compartment concept

Main Lectures: From Peptones to Peptides - A Historical Retrospect; Knowledge-Based Design of Novel Peptides; Insulin-Like Growth Factors: Structure-activity Relationships · Methodology of Synthesis · Physical Studies on Peptides · Biologically Active Peptides · Miscellaneous: Including Structural Investigation · Participants · Authors' Index · Subject Index.

Price is subject to change without notice

de Gruyter · Berlin · New York

de Gruyter References

NEW, COMPLETELY REVISED THIRTEENTH EDITION

American Universities and Colleges

Produced in collaboration with the American Council on Education

1987. 21 x 27.5 cm. XX, 2040 pages. With numerous charts and tables.

Cloth DM 298,- ISBN 3 11 010902 6

American Universities and Colleges is published every four years.

We invite standing orders.

Based on a new survey begun in September 1986, this completely updated and expanded edition of **American Universities and Colleges** continues the tradition of being the foremost reference book on postsecondary education in the United States. Prepared in collaboration with the American Council on Education, the major coordinating body of higher education, the revised Thirteenth Edition provides the most comprehensive collection of information on accredited institutions offering baccalaureate degrees and above.

The Thirteenth Edition is enlarged both in the number of institutions represented and the amount of information provided. Over 1,900 institutions are covered, including 125 new institutions recently accredited.

American Universities and Colleges provides both the essential statistical data (tuition, room, board, admissions requirements, financial aid, enrollments, etc.) and all the other information equally important to decision making (student life, library holdings, physical plant, accelerated and study-abroad programs, etc.). A full section is devoted to the foreign student in U.S. institutions. Included is a list of overseas offices with counseling services on study in the U.S., plus a number of tables dealing with various aspects of foreign student enrollments from 1954–55 to 1985–86.

Another section deals with professional education in the U.S., using nearly 40 subject areas to discuss the institutions offering professional programs, admission and degree requirements, and licensing and certification programs. Other sections deal with such diverse topics as the history of higher education in the U.S. and the academic costume code.

From reviews of the Twelfth Edition:

"To sum up these five guides . . . no high school, public, or academic library reference collection is adequate without AUC."

Choice

"The new edition continues the tradition of completeness . . . No other general purpose college guide offers similar coverage . . . belongs in every academic, public, and high school library, for it provides perspectives on colleges other guides do not even consider."

Wilson Library Bulletin

de Gruyter · Berlin · New York

Geräte

1. Spektrallinienphotometer 6118 mit angeschlossenen Kompensationsschreiber 6511, Fa. Eppendorf-Gerätebau, Filter Hg 546 nm, Halbmikroküvetten aus optischem Spezialglas, Schichtdicke 1 cm, mit auf 25 °C temperiertem Küvettenhalter.
2. Vollmechanisiertes Analysengerät ACP 5040, Fa. Eppendorf-Gerätebau (Geräteeinstellung s. Tabelle 1).

Vergleichs-Methoden

Der enzymatische UV-Test nach *Wahlefeld* et al. (22) bei der Meßwellenlänge 365 nm, der als Referenzmethode diente, sowie das kinetische Verfahren mit alkalischer Pikratlösung ohne Enteiweißung nach *Helger* et al. (2) wurden unter Verwendung der genannten Testpackungen nach Angaben der Hersteller durchgeführt und ausgewertet.

Kinetisches Verfahren mit alkalischer 3,5-Dinitrobenzoesäure ohne Enteiweißung

Prinzip

Kreatinin bildet mit alkalischer 3,5-Dinitrobenzoesäure einen orange-roten Farbkomplex, dessen Absorption bei 546 nm erfaßt und zur Auswertung verwendet wird.

Messung

Entsprechend den in Tabelle 1 angegebenen Einstellungen werden mit dem vollmechanisierten Analysengerät ACP 5040 41,3 Sekunden nach dem Start der Reaktion die Absorptionsänderungen von 4 Meßintervallen innerhalb einer Gesamtzeit von 6,7 Sekunden ermittelt.

Tab. 1. Kinetisches Verfahren zur Bestimmung von Kreatinin im Serum mit alkalischer 3,5-Dinitrobenzoesäure ohne Enteiweißung. Einstellung am vollmechanisierten Analysengerät ACP 5040, Fa. Eppendorf Gerätebau.

| | |
|------------------------------------|-----------------|
| Temperatur | 25 °C |
| Takt | 12 Sekunden |
| Wellenlänge | 546 nm |
| Abgleich | 0,0 |
| Standardreihe | 88 – 530 µmol/l |
| Rotordrehung | 1 |
| Auswerte-Nr. | 1 |
| Spülposition | 18 |
| Startposition* | 3 |
| Probenvolumen* | 25 µl |
| 3,5-Dinitrobenzoesäure* 300 mmol/l | 250 µl |
| Natronlauge* 0,5 mol/l | 50 µl |

* Bedingungen, die in Vorversuchen variiert wurden.

Berechnung

Die Ermittlung der Kreatinin-Konzentration erfolgt über die an mitgeführten Standardlösungen gefundenen Absorptionsdifferenzen.

Überprüfung der Reaktionsverläufe

Der Reaktionsverlauf in Abhängigkeit von den Endkonzentrationen der verwendeten Reagentien bzw. des Kreatinins wurde an einem Spektrallinienphotometer sowie an einem vollmechanisierten Analysengerät überprüft. Die Bedingungen sind in den Legenden zu den jeweiligen Abbildungen aufgeführt.

Ergebnisse

Abhängigkeit des Reaktionsverlaufs von der Konzentration an 3,5-Dinitrobenzoesäure im Ansatz

Messung am Spektrallinienphotometer

In Abbildung 1 ist der zeitliche Ablauf der Komplexbildung aus 177 µmol/l Kreatinin und 3,5-Dinitrobenzoesäure in Natronlauge unter Variation der Konzentration an 3,5-Dinitrobenzoesäure aufgezeichnet. Es zeigt sich, daß die Absorptionsänderung in den ersten Minuten mit steigender Konzentration an 3,5-Dinitrobenzoesäure zunimmt. Die absolute Höhe des Meßsignals sowie die geringe Abnahme der Absorption im weiteren Verlauf wird von der 3,5-Dinitrobenzoesäure-Konzentration beeinflusst.

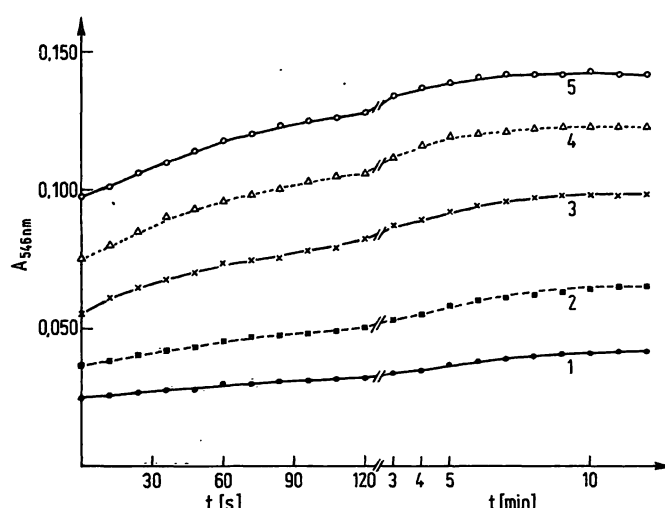


Abb. 1. Bildung eines Farbkompleses zwischen Kreatinin und 3,5-Dinitrobenzoesäure in Abhängigkeit von der Zeit und von der Konzentration an 3,5-Dinitrobenzoesäure (50 – 400 mmol/l).

Messung am Spektrallinienphotometer Eppendorf 6118.

Reaktionsansatz:

Endvolumen 1300 µl.

100 µl Serum, Kreatinin-Konzentration 177 µmol/l.

200 µl 0,5 mol/l Natronlauge, Endkonzentration 77 mmol/l.

1000 µl Farbreagens

- | | |
|---|-----------------------------------|
| 1 | 50 mmol/l 3,5-Dinitrobenzoesäure |
| 2 | 100 mmol/l 3,5-Dinitrobenzoesäure |
| 3 | 200 mmol/l 3,5-Dinitrobenzoesäure |
| 4 | 300 mmol/l 3,5-Dinitrobenzoesäure |
| 5 | 400 mmol/l 3,5-Dinitrobenzoesäure |

Höhere Kreatinin-Konzentrationen führen zu beschleunigter Farbkomplesbildung und somit zu steileren Kurvenverläufen.

Messung mit einem vollmechanisierten Analysengerät

Der Reaktionsablauf in Abhängigkeit von der Zeit und von den Konzentrationen der Reagentien sowie

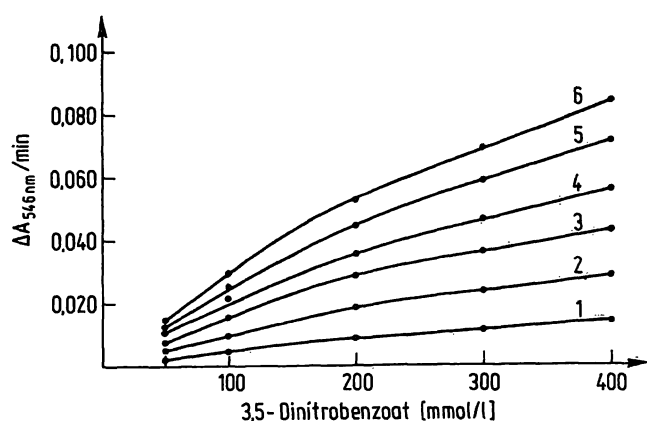


Abb. 2. Änderung des Meßsignals ($\Delta A/\text{min}$), gemessen zwischen der 41,3. bis 48. Sekunde nach Start der Reaktion in Abhängigkeit von der 3,5-Dinitrobenzoat-Konzentration (50–400 mmol/l).

Messung am vollmechanisierten Analysengerät Eppendorf ACP 5040.

Ausführung s. Tab. 1.

Reaktionsansatz: Endvolumen 325 μl .

250 μl 3,5-Dinitrobenzoat (50–400 mmol/l). 50 μl 0,5 mol/l Natronlauge,

Endkonzentration: Natronlauge 77 mmol/l.

25 μl wäßrige Standardlösungen.

- | | |
|---|---------------------------------|
| 1 | 88 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin |
| 2 | 177 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin |
| 3 | 265 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin |
| 4 | 354 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin |
| 5 | 442 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin |
| 6 | 530 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin |

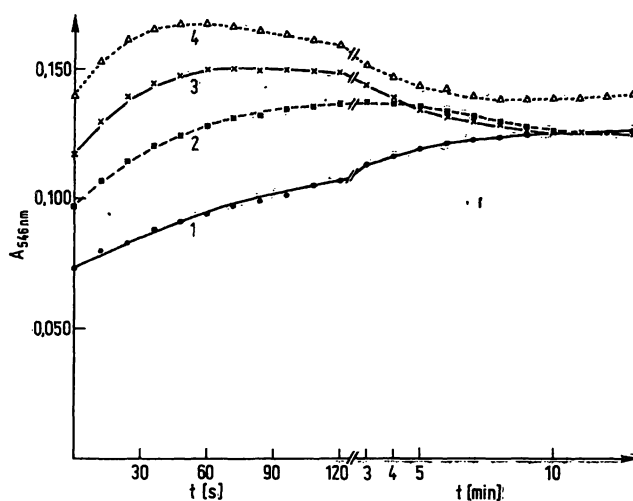


Abb. 3. Bildung eines Farbkompleses zwischen Kreatinin- und 3,5-Dinitrobenzoat in Abhängigkeit von der Zeit und von der Konzentration an Natronlauge (0,5–2,0 mol/l).

Messung am Spektrallinienphotometer Eppendorf 6118.

Reaktionsansatz: Endvolumen 1300 μl .

100 μl Serum, Kreatinin-Konzentration 177 $\mu\text{mol/l}$.

1000 μl 300 mmol/l 3,5 Dinitrobenzoat.

Endkonzentration: 231 mmol/l:

200 μl Startreagens.

- | | |
|---|-----------------------|
| 1 | 0,5 mol/l Natronlauge |
| 2 | 1,0 mol/l Natronlauge |
| 3 | 1,5 mol/l Natronlauge |
| 4 | 2,0 mol/l Natronlauge |

des Kreatinins wurde im 12-Sekundentakt während der ersten 132 Sekunden am ACP 5040 verfolgt. Die Ergebnisse (s. Abb. 2) entsprechen den mit dem Spektrallinienphotometer ermittelten Daten. Die Änderung des Meßsignals pro Minute ($\Delta A/\text{min}$) steigt mit zunehmender 3,5-Dinitrobenzoat-Konzentration bei konstanter Natronlauge-Konzentration an und durchläuft kein Maximum.

Abhängigkeit des Reaktionsverlaufs von der Konzentration an Natronlauge im Ansatz

Messung am Spektrallinienphotometer

In Abbildung 3 mit der Kreatinin-Konzentration von 177 $\mu\text{mol/l}$ ist der zeitliche Ablauf der Reaktion unter Variation der Natronlauge-Konzentration als Startreagens aufgezeichnet. Die Absorptionzunahme erfolgt um so steiler und schneller, je stärker alkalisch der Ansatz wird.

Messung mit einem vollmechanisierten Analysengerät

Die Ergebnisse bei Meßzeiten zwischen 12 und 132 Sekunden bestätigen die manuell gewonnenen Daten. Die Änderung des Meßsignals pro Minute ($\Delta A/\text{min}$), gemessen innerhalb der 41,3. und 48. Sekunde mit

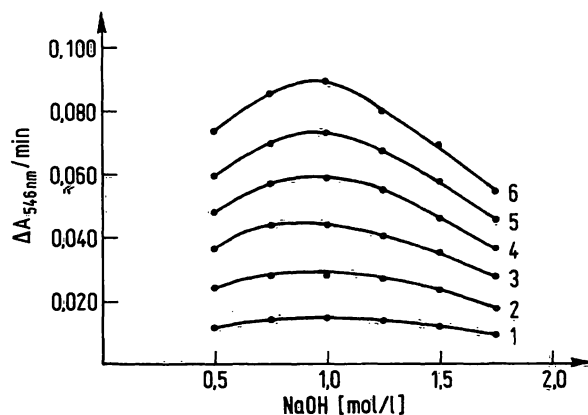


Abb. 4. Änderung des Meßsignals ($\Delta A/\text{min}$), gemessen innerhalb der 41,3. bis 48. Sekunde in Abhängigkeit von der Konzentration der verwendeten Natronlauge als Startreagens (0,5–1,75 mol/l).

Messung am vollmechanisierten Analysengerät Eppendorf ACP 5040.

Ausführung s. Tab. 1.

Reaktionsansatz: Endvolumen 325 μl .

50 μl Natronlauge (0,5–1,75 mol/l). 250 μl 300 mmol 3,5-Dinitrobenzoat/l.

Endkonzentration: 3,5-Dinitrobenzoat 231 mmol/l.

25 μl wäßrige Standardlösungen.

- | | |
|---|---------------------------------|
| 1 | 88 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin |
| 2 | 177 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin |
| 3 | 265 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin |
| 4 | 354 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin |
| 5 | 442 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin |
| 6 | 530 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin |

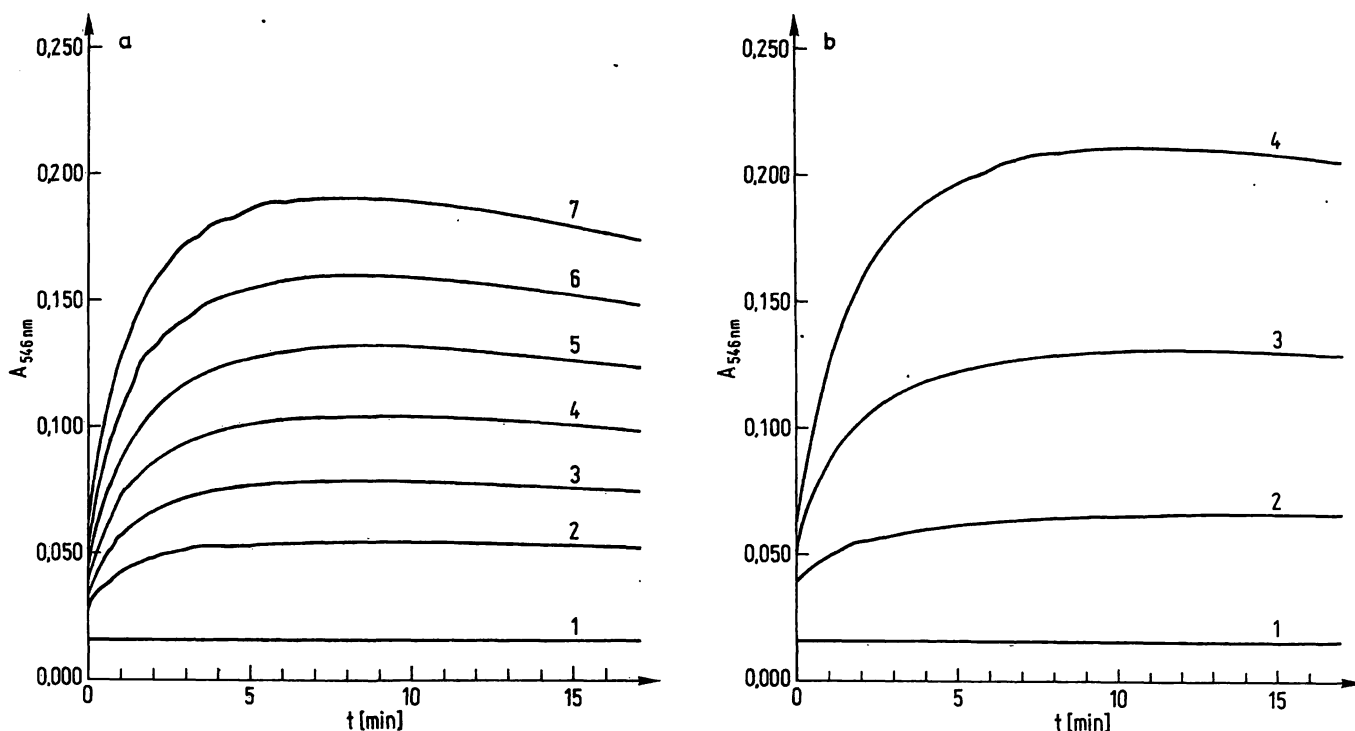


Abb. 5. Kinetische Methode zur Bestimmung von Kreatinin mit 3,5-Dinitrobenzoat ohne Enteiweißung. Abhängigkeit des Reaktionsverlaufs von der Kreatinin-Konzentration in wäßrigen Standardlösungen (Abb. 5a: 88–530 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin) bzw. im Serum von drei verschiedenen Patienten (Abb. 5b: 88, 265 und 530 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin).

Messung am Spektrallinienphotometer Eppendorf 6118.

Reaktionsansatz: Endvolumen 1300 μl , 1000 μl 300 mmol/l 3,5-Dinitrobenzoat, 200 μl 0,5 mmol/l Natronlauge.

Endkonzentration: 3,5-Dinitrobenzoat 231 mmol/l, Natronlauge 77 mmol/l,

a. 100 μl wäßrige Standardlösungen.

- | | |
|---|---------------------------------|
| 1 | 0 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin |
| 2 | 88 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin |
| 3 | 177 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin |
| 4 | 265 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin |
| 5 | 354 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin |
| 6 | 442 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin |
| 7 | 530 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin |

b. 100 μl Serum.

- | | |
|---|---------------------------------|
| 1 | 0 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin |
| 2 | 88 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin |
| 3 | 265 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin |
| 4 | 530 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin |

dem ACP 5040, steigt mit zunehmender Natronlauge-Konzentration und erreicht ein Maximum mit 1 mol/l Natronlauge als Startreagens; dies entspricht einer Endkonzentration von 154 mmol/l (s. Abb. 4).

Abhängigkeit des Meßsignals von der Kreatinin-Konzentration im Ansatz

Die zeitliche Änderung der durch die Bildung des farbigen Komplexes hervorgerufenen Absorption in Abhängigkeit von der Kreatinin-Konzentration wurde mit dem Spektrallinienphotometer Eppendorf 6118 bestimmt. Die Daten sind in den Abbildungen 5a und b dargestellt. Wäßrige Lösungen und Serumproben weisen einen ähnlichen Reaktionsverlauf auf. Er zeigt einen steilen Absorptionsanstieg während der ersten 60 Sekunden nach Mischen der Reagentien, ein flaches Maximum zwischen der 8. und etwa 12. Minute und einen anschließenden allmählichen Abfall, der während des überprüften Zeitraums von 30 Minuten nicht zum Stillstand kommt.

Die Analysen am ACP 5040 erfolgten mit den in Tabelle 1 genannten Reagentien und Einstellungen. Bei Variation der Kreatinin-Konzentration in wäßrigen Lösungen und in wäßriger Human-Albumin-Lösung (40 g/l) ergibt sich eine geradlinige Beziehung zwischen der Konzentration der zu analysierenden Substanz und dem Meßsignal bis zu einer Kreatinin-Konzentration von 8840 $\mu\text{mol/l}$.

Das gleiche Ergebnis wird mit Poolserum gefunden, dessen Kreatiningehalt durch Zusatz der Substanz bei Konzentrationen zwischen 106 und 8946 $\mu\text{mol/l}$ liegt (s. Abb. 6).

Innerhalb der 41,3. und 48. Sekunde nach dem Start der Reaktion wurde für eine Kreatinin-Konzentration von 88 $\mu\text{mol/l}$ bei der Dinitrobenzoat-Methode als Mittelwert aus 5 Bestimmungen ein $\Delta A/\text{min}$ von 0,0235 gemessen. Die Pikrat-Methode ergab unter den gleichen Bedingungen ein $\Delta A/\text{min}$ von 0,0160. Aus diesen Werten errechnet sich eine etwa 1,5-fach höhere Empfindlichkeit der Dinitrobenzoat-Methode gegenüber der Pikrat-Methode.

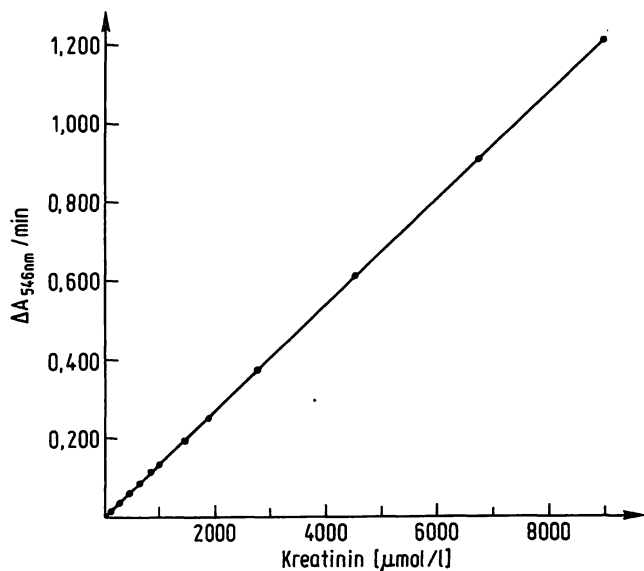


Abb. 6. Kinetische Methode zur Bestimmung von Kreatinin mit 3,5-Dinitrobenzoat ohne Enteiweißung. Abhängigkeit des Meßsignals von der Kreatinin-Konzentration im Poolserum. Messung am vollmechanisierten Analysengerät Eppendorf ACP 5040. Testbedingungen s. Tab. 1. Poolserum mit einer Kreatinin-Konzentration von 106 $\mu\text{mol/l}$ wurde mit Kreatinin aufgestockt, so daß Kreatinin-Konzentrationen von 283, 460, 636, 813, 990, 1432, 1874, 2758, 4526, 6736 und 8946 $\mu\text{mol/l}$ vorlagen.

Reproduzierbarkeit des Verfahrens

An selbsthergestellten Poolseren mit einer Kreatinin-Konzentration von 52 und 251 $\mu\text{mol/l}$ wurde in der Serie ($n = 20$) eine relative Standardabweichung von 3,4% bzw. 1,4% gefunden.

Von Tag zu Tag ($n = 20$) ergab sich durch Analysen von Kontrollproben mit einer Kreatinin-Konzentration von 74 und 307 $\mu\text{mol/l}$ eine relative Standardabweichung von 3,6% bzw. 2,0%. Die Abweichung der gefundenen Mittelwerte von den deklarierten Werten 66 bzw. 314 $\mu\text{mol/l}$, die mit der Methode nach Helger et al. (2) ermittelt wurden, betrugen + 8 bzw. - 7 $\mu\text{mol/l}$.

In Aufstockungsversuchen lag die Wiederfindungsrate für zugesetztes Kreatinin im Konzentrationsbereich von 106–8946 $\mu\text{mol/l}$ Serum zwischen 98 und 102%.

Störfaktoren

Als wesentliche interferierende Substanzen bei der Kreatinin-Bestimmung sowohl mit der Pikrat- als auch mit der 3,5-Dinitrobenzoat-Methode sind aus der Literatur Acetessigsäure, Aceton, Ascorbinsäure, Bilirubin, Cephalosporine, Hämoglobin, Human-Albumin, Pyruvat und Triglyceride (2, 8, 9, 11, 21, 23–33) zu entnehmen. Bei der Überprüfung der Störfaktoren wurde die Kreatinin-Stammlösung (s. Lösung

4) mit den Stammlösungen 6–13 und bidest. Wasser so verdünnt, daß bei allen Verdünnungsreihen eine Kreatinin-Konzentration von ca. 177 $\mu\text{mol/l}$ in 40 g/l Human-Albumin vorlag.

Einfluß von Bilirubin

Die Abhängigkeit der Störung durch Bilirubin von der 3,5-Dinitrobenzoat- bzw. von der Natronlauge-Konzentration ist in Tabelle 2 bzw. 3 dargestellt. Mit steigender Dinitrobenzoat-Konzentration nimmt die Bilirubin-Störung ab (s. Tab. 2) und mit steigender Natronlauge-Konzentration zu (s. Tab. 3). Deshalb wird im Testansatz eine hohe 3,5-Dinitrobenzoat-Endkonzentration von 231 mmol/l und eine niedrige Natronlauge-Endkonzentration von 77 mmol/l gewählt. Dies entspricht einer Farbreagens-Konzentration von 300 mmol/l 3,5-Dinitrobenzoat und einer Startreagens-Konzentration von 0,5 mol/l Natronlauge. Höhere Konzentrationen an Dinitrobenzoat weisen geringere Stabilität auf und niedrige Natronlauge-Konzentrationen ergeben ein geringeres Meßsignal.

Unter den obengenannten Bedingungen innerhalb der Meßzeit von der 41,3. bis 48. Sekunde ist keine Stö-

Tab. 2. Störung der Kreatinin-Bestimmung durch Bilirubin in Abhängigkeit von der 3,5-Dinitrobenzoat-Konzentration (50–400 mmol/l, 250 μl) bei einer konstanten Natronlauge-Konzentration von 0,5 mol/l (50 μl). Messung mit dem vollmechanisierten Analysengerät Eppendorf ACP 5040, Ausführung s. Tab. 1. Kreatinin-Konzentration 191 $\mu\text{mol/l}$ in 40 g/l Human-Albumin-Lösung (25 μl).

| Bilirubin-Konzentration ($\mu\text{mol/l}$) | 3,5-Dinitrobenzoat-Konzentration (mmol/l) | | | | |
|---|---|-----|-----|-----|-----|
| | 50 | 100 | 200 | 300 | 400 |
| | gefundene Kreatinin-Konzentration ($\mu\text{mol/l}$) | | | | |
| 0 | 192 | 192 | 193 | 190 | 194 |
| 171 | 214 | 210 | 199 | 190 | 187 |
| 342 | 219 | 210 | 200 | 188 | 183 |

Tab. 3. Störung der Kreatinin-Bestimmung durch Bilirubin in Abhängigkeit von der Natronlauge-Konzentration (0,25–1,25 mol/l, 50 μl) bei einer konstanten 3,5-Dinitrobenzoat-Konzentration von 300 mmol/l (250 μl). Messung mit dem vollmechanisierten Analysengerät Eppendorf ACP 5040, Ausführung s. Tab. 1. Kreatinin-Konzentration 191 $\mu\text{mol/l}$ in 40 g/l Human-Albumin-Lösung (25 μl).

| Bilirubin-Konzentration ($\mu\text{mol/l}$) | Natronlauge-Konzentration (mol/l) | | | | | | |
|---|---|-----|-----|-----|------|-----|------|
| | 0,25 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,75 | 1,0 | 1,25 |
| | gefundene Kreatinin-Konzentration ($\mu\text{mol/l}$) | | | | | | |
| 0 | 197 | 187 | 192 | 189 | 189 | 186 | 189 |
| 171 | 160 | 162 | 177 | 183 | 202 | 223 | 248 |
| 342 | 140 | 147 | 169 | 184 | 223 | 264 | 309 |

Tab. 4. Vergleich der Störung der Kreatinin-Bestimmung durch Bilirubin bei der 3,5-Dinitrobenzoat-, der Pikrat-Methode und dem enzymatischen UV-Test. Probe 1 enthält 106 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin und 9 $\mu\text{mol/l}$ Bilirubin. Proben 2–7 enthalten 106 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin und durch Aufstockung der Probe 1 mit Bili-Control 212–1211 $\mu\text{mol/l}$ Bilirubin. Proben 8–17 stellen Patientenserum mit verschiedenen Kreatinin- und Bilirubin-Konzentrationen dar.

| Proben-Nr. | Kreatinin-Konzentration ($\mu\text{mol/l}$) | | | Gesamt-Bilirubin-Konzentration ($\mu\text{mol/l}$) |
|------------|---|-----------------------|----------------|--|
| | 3,5-Dinitrobenzoat-Methode | Enzymatischer UV-Test | Pikrat-Methode | |
| 1 | 106 | 110 | 111 | 9 |
| 2 | 110 | 111 | 79 | 212 |
| 3 | 112 | 110 | 65 | 400 |
| 4 | 114 | 103 | 57 | 585 |
| 5 | 109 | 110 | 44 | 693 |
| 6 | 108 | 103 | 30 | 929 |
| 7 | 106 | * | ** | 1211 |
| 8 | 85 | 85 | 18 | 120 |
| 9 | 93 | 118 | 66 | 123 |
| 10 | 452 | 439 | 370 | 156 |
| 11 | 65 | 64 | 9 | 174 |
| 12 | 906 | 834 | 726 | 186 |
| 13 | 69 | 94 | 53 | 188 |
| 14 | 927 | 866 | 740 | 198 |
| 15 | 476 | 474 | 342 | 224 |
| 16 | 97 | 145 | 63 | 263 |
| 17 | 392 | 392 | 279 | 294 |

* Nicht bestimmbar (Leerwerte über 2,000).

** Absorptionsabnahme, Meßsignal daher nicht auswertbar.

rung durch Bilirubin zu beobachten. So führt die Aufstockung eines Patientenserums (etwa 106 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin und 8,6 $\mu\text{mol/l}$ Bilirubin) mit Bilirubin in verschiedenen Konzentrationen bis 1211 $\mu\text{mol/l}$ nicht zu einer meßbaren Störung.

Im Gegensatz dazu zeigt die Pikrat-Methode beispielsweise bei 585 $\mu\text{mol/l}$ Bilirubin eine Abnahme um 53 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin (s. Tab. 4, Probe 1–7). Bei höheren Bilirubin-Konzentrationen wird bei der Pikrat-Methode anstelle einer Absorptionszunahme sogar eine -abnahme registriert. Vergleichsuntersuchungen zwischen der 3,5-Dinitrobenzoat-, der Pikrat-Methode und dem enzymatischen UV-Test an Patientenserum mit ausgeprägter Hyperbilirubinämie sind in Tabelle 4, Probe 8–17, dargestellt. Gegenüber der 3,5-Dinitrobenzoat-Methode und dem enzymatischen UV-Test weist die Pikrat-Methode niedrigere Kreatinin-Konzentrationen bei den Patientenserum auf.

Einfluß von Hämoglobin

Die Hämoglobin-Stammulösung wurde mit der Albumin enthaltenden Kreatinin-Stammulösung (s. Lösung 4) und bidest. Wasser so verdünnt, daß Konzentrationen von 0,1–2 g/l Hämoglobin in einer Lösung mit

177 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin und 40 g/l Human-Albumin vorlagen. Hämoglobin-Konzentrationen bis 1,2 g/l zeigen keine Interferenz bei der 3,5-Dinitrobenzoat-Methode. Höhere Konzentrationen an Hämoglobin führen zu einer Abnahme der Kreatinin-Konzentration, beispielsweise bei einer Hämoglobin-Konzentration von 2 g/l zu einer Verringerung um 18 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin. Vergleichsuntersuchungen mit hämolytischen Patientenserum bestätigen die Ergebnisse der Verdünnungsreihe. Daher dürfen Patientenserum mit Hämoglobin-Konzentrationen von über 1 g/l nicht mit der 3,5-Dinitrobenzoat-Methode analysiert werden.

Die Pikrat-Methode zeigt bei der o. g. Verdünnungsreihe eine stärkere Störung durch Hämoglobin als die Dinitrobenzoat-Methode. 2 g/l Hämoglobin führen zu einer Abnahme der Kreatinin-Konzentration um 53 $\mu\text{mol/l}$.

Der enzymatische UV-Test zeigt ab 0,5 g/l Hämoglobin eine Erniedrigung der Kreatinin-Konzentration.

Einfluß von Triglyceriden

Die Intralipid-Stammemulsion wurde ebenfalls mit der Albumin enthaltenden Kreatinin-Stammulösung (s. Lösung 4) und bidest. Wasser verdünnt. Die erhaltenen Triglycerid-Konzentrationen lagen zwischen 1,14 und 13,68 mmol/l in einer Emulsion, die 177 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin und 40 g/l Human-Albumin enthielt. Diese Verdünnungsreihe zeigt bei der Kreatinin-Bestimmung mit der 3,5-Dinitrobenzoat-Methode keine Störung bis zu einer Triglycerid-Konzentration von 11,40 mmol/l. Dagegen können Proben mit Triglycerid-Konzentrationen über 2,85 mmol/l mit der Pikrat-Methode nicht unverdünnt bestimmt werden.

Lipämische Patientenserum mit bis zu 27,13 mmol/l Triglyceriden konnten bei der 3,5-Dinitrobenzoat-Methode unverdünnt eingesetzt werden. Patientenproben mit höheren Triglycerid-Konzentrationen standen nicht zur Verfügung. Sowohl bei der Pikrat-Methode als auch bei dem enzymatischen UV-Test zeigten dagegen unverdünnte lipämische Serum bereits Ausgangsabsorptionswerte von über 2,000.

Einfluß von Cephalosporinen

Tabelle 5 zeigt die Störungen durch verschiedene Cephalosporine. Anhand der Tabelle wird ersichtlich, daß Cephalosporin-Konzentrationen bis 250 mg/l, d. h. im therapeutischen Bereich, bei der 3,5-Dinitrobenzoat-Methode nicht stören. Dagegen zeigt die Pikrat-Methode bereits ab 100 mg/l Cephalosporine einen Anstieg der Kreatinin-Konzentration (27–33).

Tab. 5. Vergleich der Störung der Kreatinin-Bestimmung durch Cephalosporine bei der 3,5-Dinitrobenzoat- und der Pikrat-Methode. Kreatinin-Konzentration von 177 $\mu\text{mol/l}$ in 40 g/l in Human-Albumin-Lösung und unterschiedliche Cephalosporine in verschiedenen Konzentrationen (50–250 mg/l). Die Messungen wurden mit dem Eppendorf ACP 5040 durchgeführt.

| Cephalosporine | Cephalosporine (mg/l) in 177 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin mit 40 g/l Human-Albumin | | | | | |
|----------------|---|----------------|----------------------------|----------------|----------------------------|----------------|
| | 50 | | 100 | | 250 | |
| | 3,5-Dinitrobenzoat-Methode | Pikrat-Methode | 3,5-Dinitrobenzoat-Methode | Pikrat-Methode | 3,5-Dinitrobenzoat-Methode | Pikrat-Methode |
| Cefoxitin | 177 | 186 | 177 | 203 | 177 | 248 |
| Cephaloglycin | 186 | 186 | 186 | 194 | 194 | 212 |
| Cephaloridin | 177 | 186 | 177 | 194 | 168 | 203 |
| Cephalothin | 186 | 194 | 177 | 212 | 168 | 256 |

Einfluß von weiteren Pseudokreatinin-Chromogenen und anderen Serumbestandteilen

Anhand ähnlicher Verdünnungsreihen wie den bisher beschriebenen konnten mit der 3,5-Dinitrobenzoat-Methode keine Störungen durch Human-Albumin, Glucose, Ascorbinsäure, Aceton und Acetessigsäure nachgewiesen werden. Dagegen zeigt Brenztraubensäure bei einer Konzentration von 350 $\mu\text{mol/l}$ fälschlicherweise um 25 $\mu\text{mol/l}$ erhöhte Kreatinin-Konzentrationen.

Im Vergleich dazu ergibt die kinetische Pikrat-Methode (2) mit Brenztraubensäure in gleicher Konzentration eine Erhöhung der Kreatinin-Konzentration um nur 8 $\mu\text{mol/l}$. Ascorbinsäure und Glucose haben keinen Einfluß auf diese Methode. Allerdings weist sie Störungen durch Acetessigsäure (2,79 mmol/l Acetessigsäure bewirken eine Erhöhung um 62 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin) und Aceton (8,61 mmol/l Aceton ergeben eine Erhöhung um 194 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin) auf. Human-Albumin führt bei der Pikrat-Methode zu einer Erniedrigung der Kreatinin-Konzentration, beispielsweise bei 50 g/l Human-Albumin um 9 $\mu\text{mol/l}$ Kreatinin.

Vergleichsuntersuchungen

Die hier beschriebene Methode für die Kreatinin-Bestimmung im Serum wurde mit der kinetischen Pikrat-Methode (2) und dem enzymatischen UV-Test (22) anhand von 212 Patientenseren mit Kreatinin-Konzentrationen zwischen 53 und 1052 $\mu\text{mol/l}$ verglichen (Abb. 7 und 8). Die statistische Auswertung der Daten nach *Passing & Bablok* (34) ist in Tabelle 6 dargestellt.

Dabei wird ersichtlich, daß die 3,5-Dinitrobenzoat-Methode eine gute Korrelation zu dem enzymatischen UV-Test aufweist. Die modifizierte Jaffé-Methode

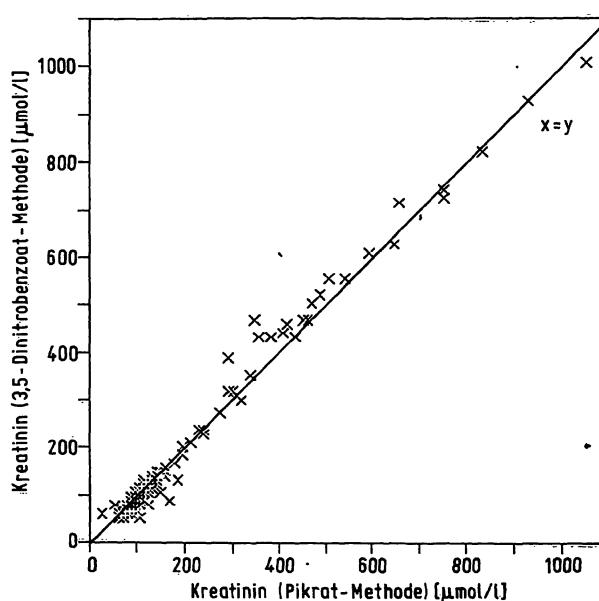


Abb. 7. Vergleich der 3,5-Dinitrobenzoat-Methode mit der kinetischen Pikrat-Methode an 212 Patientenseren.

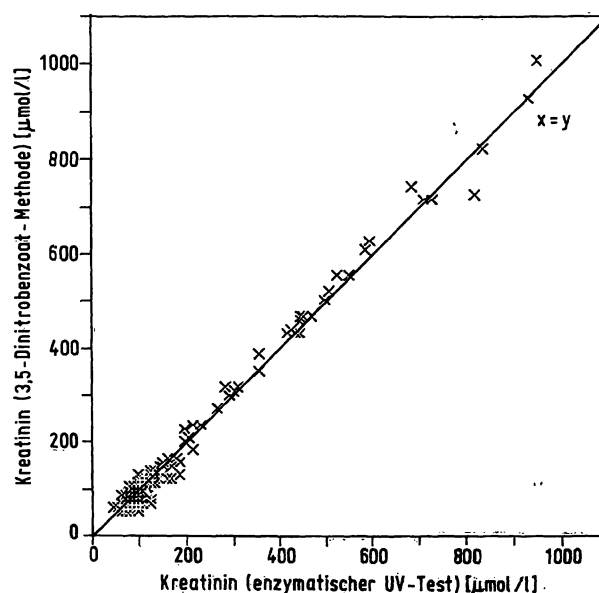


Abb. 8. Vergleich der 3,5-Dinitrobenzoat-Methode mit dem enzymatischen UV-Test an 212 Patientenseren.

Tab. 6. Statistische Kenngrößen nach *Passing & Bablok* für den Vergleich der drei verwendeten Methoden zur Messung der Kreatinin-Konzentration im Serum (n = 212).

| Verglichene Methode | n | Lineare Regression | | <i>Passing & Bablok</i> | | | |
|---|-----|--------------------|------------------|-----------------------------|------------|--|--|
| | | r | y = ax + b | y = ax + b | Linearität | a Signifikante Abweichung von 1 (Konfidenzintervall) | b Signifikante Abweichung von 0 (Konfidenzintervall) |
| x = enzymatischer UV-Test y = 3,5-Dinitrobenzoat-Methode | 212 | 0,994 | y = 1,03x - 7,2 | y = 1,01x - 1,1 | Ja | Nein (1,00 bis 1,04) | Nein (-4,4 bis 0,0) |
| x = Pikrat-Methode y = 3,5-Dinitrobenzoat-Methode | 212 | 0,992 | y = 1,04x - 10,4 | y = 1,01x - 9,8 | Ja | Nein (1,00 bis 1,06) | Ja (-15,8 bis -8,8) |
| x = enzymatischer UV-Test y = Pikrat-Methode | 212 | 0,989 | y = 0,98x + 4,9 | y = 1,00x + 0,0 | Ja | Nein (0,97 bis 1,00) | Nein (0,0 bis 4,4) |

nach *Helger et al.* (2) führt im Vergleich zur 3,5-Dinitrobenzoat-Methode zu signifikant erhöhten Werten.

Diskussion

In vielen Arbeiten zur Bestimmung der Kreatinin-Konzentration nach der Methode von *Jaffé* wurde versucht, durch Variation der Reaktionsbedingungen die Störungen infolge interferierender Substanzen herabzusetzen (2–12). Mit der enzymatischen Methode (22) ist eine spezifische Bestimmung für Kreatinin gefunden worden, die jedoch entscheidende Nachteile zeigt. Die im Serum enthaltenen Substrate wie Pyruvat und Kreatin werden von den im Test enthaltenen Hilfsenzymen unter NADH-Verbrauch umgesetzt. Deshalb muß zu jedem Meßwert ein Probenleerwert mitgeführt und der Reaktionsansatz ca. 30 Minuten inkubiert werden. Darüberhinaus sind vor allem bei lipämischen, ikterischen und hämolytischen Proben die Absorptionen der Probenleerwerte so hoch, daß eine Beeinträchtigung der Ergebnisse nicht auszuschließen ist.

Aus den obengenannten Gründen ist für die Routineuntersuchung die *Jaffé*-Methode und die Reaktion mit 3,5-Dinitrobenzoat weiterhin von Bedeutung. Es erschien uns somit gerechtfertigt, nach weiteren Möglichkeiten zu suchen, um die Spezifität der Kreatinin-Bestimmung zu erhöhen.

Die bisher entwickelten Testverfahren mit 3,5-Dinitrobenzoat (18–21) sind technisch umständlich, da die zu untersuchenden Seren enteiweißt werden müssen. Ein weiterer Nachteil liegt darin, daß die bisher für die Solvatisierung der Dinitrobenzoesäure verwen-

deten organischen Lösungsmittel (z. B. Dimethylsulf-oxid) eine aggressive Wirkung auf Schlauchmaterialien der vollmechanisierten Geräte aufweisen. Bei der hier beschriebenen Methode wird die Dinitrobenzoesäure in wäßriger Natronlauge gelöst; eine vorherige Enteiweißung der Seren ist nicht notwendig.

Der eigentliche Reaktionsmechanismus, welcher der Farbkomplexbildung zwischen Kreatinin und 3,5-Dinitrobenzoesäure zugrundeliegt, ist bisher nicht geklärt. Es bedürfte u. a. aufwendiger physikalisch-chemischer Methoden, um nachzuweisen, ob die Komplexbildung ähnlich dem *Janovsky*-Komplex über die C-Atome des aromatischen Ringes in Position 2, 4 bzw. 6 erfolgt (35). Eine weitere Möglichkeit ist eine Komplexbildung über eine der Nitrogruppen in Position 3 bzw. 5. Außerdem ist ein stöchiometrischer 1 : 1-Komplex im Vergleich zu einem 2 : 1-Komplex oder weiteren Formen zu diskutieren. Diesbezüglich sind sich verschiedene Autoren selbst bei der lange bekannten und häufig untersuchten Pikrat-Methode nicht einig (36–38). Eine Aufklärung des Reaktionsmechanismus würde eventuell die Ergebnisse der Störeinflüsse durch die verschiedenen überprüften Serumbestandteile verständlich machen. Die dafür nötigen Untersuchungen gehen über den Rahmen der vorliegenden Arbeit hinaus.

Der Absorptionsanstieg durch die Farbkomplexbildung zwischen Kreatinin und 3,5-Dinitrobenzoat kann kinetisch oder als Endpunkt-Methode ausgewertet werden. Kinetisch gut verwertbare Differenzen erhält man nur in den ersten 60 Sekunden nach Reaktionsbeginn. Dieser Zeitraum ist für manuelle Serienanalysen in der Praxis nicht einzuhalten. Außerdem sind die Analysen wegen des begrenzten Auflösungs-

vermögens der üblichen Spektrallinienphotometer mit einem nicht unerheblichen Meßfehler belastet.

Wie aus den Abbildungen des Reaktionsverlaufes ersichtlich, wird ein Endpunkt der Reaktion nicht erreicht. Vielmehr scheint sich der Farbkomplex ab etwa 10 bis 15 Minuten nach Reaktionsstart wieder zum Teil zu zersetzen. Darüberhinaus werden die einzelnen Absorptionswerte zu diesem Zeitpunkt durch die Reaktion eventuell vorhandener Pseudokreatinin-Chromogene mit 3,5-Dinitrobenzoat beeinflusst. Eine manuelle Arbeitsweise zur routinemäßigen Ermittlung der Kreatinin-Konzentration im Serum ist mit der 3,5-Dinitrobenzoat-Methode daher nicht angebracht.

Dies stellt einen deutlichen Nachteil des Verfahrens dar.

Störungen durch Pseudokreatinin-Chromogene und andere Serumbestandteile wurden bei der 3,5-Dinitrobenzoat-Methode entweder zum größten Teil eliminiert, wie bei Aceton und Acetessigsäure, oder sehr stark reduziert, wie beispielsweise bei Bilirubin und Triglyceriden oder vermindert wie bei den Cephalosporinen.

Die vorliegende Arbeit bestätigt die Angaben der Literatur (17–21), daß sich die 3,5-Dinitrobenzoesäure wesentlich besser zur Kreatinin-Bestimmung im Serum eignet als die Pikrinsäure.

Literatur

- Jaffé, M. (1886) Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 10, 391–400.
- Helger, R., Rindfrey, H. & Hilgenfeldt, J. (1974) Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 12, 344–349.
- Popper, H., Mandel, E. & Mayer, H. (1937) Biochem. Z. 291, 354–367.
- Bartels, H. & Böhmer, M. (1971) Clin. Chim. Acta 32, 81–85.
- Bartels, H. & Böhmer, M. (1973) Med. Lab. 26, 209–215.
- Bartels, H., Böhmer, M. & Heierli, C. (1972) Clin. Chim. Acta 37, 193–197.
- Larsen, K. (1972) Clin. Chim. Acta 41, 209–217.
- Lustgarten, J. A. & Wenk, R. E. (1972) Clin. Chem. 18, 1419–1422.
- Ullmann, R. & Bonitz, K. (1976) Med. Lab. 29, 137–145.
- Knoll, E., Rebel, F. C. & Wisser, H. (1978) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 16, 239–244.
- Knoll, E. & Wisser, H. (1973) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 11, 411–414.
- Bowers, L. D. & Wong, E. T. (1980) Clin. Chem. 26, 555–561.
- Küffer, H., Takkinen, R. & Jaag, R. (1975) Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13, 244–245.
- Nanji, A. A. & Halstead, A. C. (1982) Dig. Dis. Sci. 27, 1051.
- Knight, D. R. & Trainer, T. D. (1978) Clin. Chem. 24, 1851–1852.
- Daugherty, N. A., Hammond, K. B. & Osberg, I. M. (1978) Clin. Chem. 24, 392–393.
- Benedict, S. R. & Behre, J. A. (1936) J. Biol. Chem. 114, 515–532.
- Langley, W. D. & Evans, M. (1936) J. Biol. Chem. 115, 333–341.
- Parekh, A. C., Cook, S., Sims, C. & Jung, H. D. (1976) Clin. Chim. Acta 73, 221–231.
- Sims, C. & Parekh, A. C. (1977) Ann. Clin. Biochem. 14, 227–232.
- Parekh, A. C. & Sims, C. (1977) Clin. Chem. 23, 2066–2071.
- Wahlefeld, A. W., Herz, G. & Bergmeyer, H. U. (1972) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 29, Suppl. 126, Abstract 30.1, 28.
- Watkins, P. J. (1967) Clin. Chim. Acta 18, 191–196.
- Glick, M. R., Moorehead, W. R., Oei, T. O. & Moore, G. R. (1980) Clin. Chem. 26, 1626.
- Nanji, A. A. & Campbell, D. J. (1981) Clin. Biochem. 14, 91–93.
- Mori, L. & Jarvie, T. (1983) Clin. Chem. 29, 733–734.
- Swain, R. R. & Briggs, S. L. (1977) Clin. Chem. 23, 1340–1342.
- Lanser, A., Blijenberg, B. G. & Leijnse, B. (1979) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, 633–638.
- Saah, A. J., Koch, T. R. & Drusano, G. L. (1982) J. Am. Med. Ass. 247, 205–206.
- Kirby, M. G., Gal, P., Baird, H. W. & Roberts, B. (1982) Clin. Chem. 28, 1981.
- Kroll, M. H. & Elin, R. J. (1983) Clin. Chem. 29, 2044–2048.
- Kroll, M. H., Hagengruber, C. & Elin, R. J. (1984) Clin. Chem. 30, 1386–1388.
- Kroll, M. H., Hagengruber, C. & Elin, R. J. (1984) Clin. Chem. 30, 1664–1666.
- Passing, H. & Bablok, W. (1983) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 21, 709–720.
- Kroll, M. H., Roach, N. A., Poe, B. & Elin, R. J. (1987) Clin. Chem. 33, 1129–1132.
- Blass, K. G., Thibert, R. J. & Lam, L. K. (1974) Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 12, 336–343.
- Vasiliades, J. (1976) Clin. Chem. 22, 1664–1671.
- Ng, D. S. K. & Blass, K. G. (1986) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 24, 565–570.

Prof. Dr. W. Rick
Institut für Klinische Chemie
und Laboratoriumsdiagnostik
der Universität Düsseldorf
Moorenstraße 5
D-4000 Düsseldorf 1